1971.

C Ebersohl.

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Zimmermann)

EINWIRKUNG VON GONADOTROPINEN AUF DIE IN VITRO-BIOSYNTHESE VON STEROIDEN BEIM MEERSCHWEINCHEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Claus Ebersohl

Dekan: Prof. Dr. Kulenkampff
Referent: Prof. Dr. Oertel

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promotionsdatum: 25.2.1971

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 3

II. Eigene Untersuchungen 15

III. Ergebnisse 30

IV. Diskussion 31

V. Zusammenfassung 38

VI. Schrifttum 39

I. Einleitung

Die Untersuchung gewisser Körperfunktionen bzw. gewisser Stoffwechselschritte führte zwangsläufig zu der Annahme, dass deren Steuerung durch Substanzen vorgenommen wird, die zwar im Körper selbst produziert werden, nicht aber dem Erfolgsorgan entstammen können. Für diese regulierenden Substanzen prägte man den Begriff "Hormon", der wie folgt definiert werden kann: Hormone sind Substanzen, die von einem speziellen Gewebe gebildet werden, in die Blutbahn gelangen und auf diesem Wege mehr oder minder spezifische Erfolgsorgane erreichen, in denen sie ihre Wirkung entfalten können.

Die ersten entscheidenden Experimente, die die Annahme derartiger Substanzen rechtfertigten, bestanden darin, dass man bei gonadektomierten weiblichen Mäusen durch Zufuhr eines zellfreien Gewebsextraktes aus Ovarien ein Bild erzeugen konnte, das dem eines normalen Oestrus entsprach. Dieses Experiment ist in die Literatur unter dem Namen Allen-Doisy-Test eingegangen.

Derartige Substitutionsversuche ergaben schliesslich den Hinweis auf eine Vielzahl verschiedenartigster hormoneller Substanzen, die ihrerseits

wieder ähnlichen Regulationsmechanismen unterworfen waren. Dabei war nicht nur eine reine Stimulation, sondern auch eine Hemmung im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus nachzuweisen. Für die biologisch aktiven Substanzen aus der Nebennierenrinde bzw. aus den Gonaden, die nicht nur von Seiten der chemischen Struktur, wie später zu zeigen sein wird, eine enge Verbindung aufweisen, kann folgendes Regulationsschema als gesichert angesehen werden:

Die Produktion von biologisch aktiven Steroiden aus der Nebennierenrinde, insbesondere der Corticosteroidreihe, ist abhängig von dem aus dem Hypophysenvorderlappen entstammenden Hormon Adrenocorticotrophin, abgekürzt ACTH.

Man hatte lange Zeit angenommen, dass die durch ACTH angeregte Mehrproduktion an Cortisol direkt eine Hemmung im Sinne der Rückkoppelung von ACTH in die Hypophyse bedingt. Heute muss man dieses Regulationsschema dahingehend erweitern, dass die Ausschüttung von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen durch sogenannte Releasingfaktoren aus dem Zwischenhirn gesteuert wird. Deren Ausschüttung hingegen scheint von cortisolsensitiven Rezeptoren im Zwischenhirn geregelt zu werden.

In Analogie zu diesem Zwischenhirn-Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinden-Funktionskreis konnte auch ein Funktionsschema für die Gonadenfunktion herausgearbeitet werden. Sowohl die generative als auch die

endokrine Funktion der Gonaden lässt sich durch die sogenannten Gonadotropine, die ebenfalls aus dem Hypophysenvorderlappen stammen, regulieren. Die Ausschüttung von Gonadotropinen wiederum ist durch Releasingfaktoren aus dem Zwischenhirn gesteuert, die ihrerseits genau wie bei den ACTH-Releasingfaktoren durch sexualhormonsensitive Rezeptoren reguliert werden.

Während es sich bei dem System Zwischenhirn-Hypophysenvorderlappen-(ACTH)-Nebennierenrinde um ein relativ einfaches System handelt, bei dem die einzelnen Schritte jeweils durch ein ganz bestimmtes Hormon induziert werden, liegen die Verhältnisse bei der Steuerung der Gonadenfunktion etwas komplizierter. Einmal sind männliche und weibliche Keimdrüsen zu unterscheiden, zum anderen ist die Regulation der männlichen als auch der weiblichen Keimdrüsen nicht von einer, sondern von mehreren gonadotropen Substanzen abhängig, die erst in einem sinnvollen Zusammenwirken die volle Funktionsfähigkeit der Keimdrüse gewährleisten (21).

Von den uns bekannten gonadotropen Substanzen aus dem Hypophysenvorderlappen ist einmal das sogenannte follikelstimulierende Hormon, FSH, zu nennen, das bei der Frau das Heranwachsen eines sprungreifen Follikels bedingt, zum anderen aber auch die Produktion von Oestrogenen in eben diesem Follikel stimuliert. An zweiter Stelle wäre das sogenannte

Luteinisierungshormon, LH, zu erwähnen, das für die Ausbildung des Gelbkörpers bzw. für die Produktion von Progesteron in diesem Gelbkörper verantwortlich zu machen ist (2).

Es handelt sich hier aber keineswegs um isolierte Effekte des FSH bzw. des LH im weiblichen Zyklusgeschehen, sondern, wie schon erwähnt, um ein sinnvolles Zusammenwirken. Dabei spielt offenbar das Verhältnis beider gonadotroper Substanzen zueinander eine wesentliche Rolle, nicht nur bei der Auslösung der Ovulation, sondern auch bei der Produktion der geschlechtsspezifischen weiblichen Sexualhormone (21).

Bei der verblüffenden Parallelität des adrenalen und gonadalen Funktionskreises, der engen chemischen Verwandtschaft adrenaler und gonadaler Steroidhormone und bei der teils synergistischen, teils antagonistischen Wirkung beider Steroidhormonklassen war es nicht verwunderlich, dass Wechselbeziehungen innerhalb dieser beiden Funktionskreise gefunden wurden. So ist z. B. bekannt, dass Oestrogene in der Lage sind, über eine vermehrte Bildung des Plasmaproteins Transcortin eine Erhöhung der Plasmacortisolkonzentration zu erzeugen. Dies geschieht durch eine zwar lockere, doch spezifische Bindung von Cortisol (41). Dabei ist keine endgültige Aussage über die biologische Valenz dieses vermehrten Cortisols möglich. Aber auch in der nächsthöheren Stufe, der hypophysären Regulation, können Wechselbeziehungen angenommen werden:

Einmal im Sinne eines Shiftmechanismus (48), dessen Existenz heute allerdings angezweifelt wird, zum anderen auch in Form einer simultanen Hemmung durch das eine oder andere Steroidhormon.

Für das weitere Verständnis der engen Beziehungen zwischen adrenalen und gonadalen Steroiden ist es erforderlich, das Biosyntheseschema dieser Steroidhormone kurz und vereinfacht darzustellen (9):

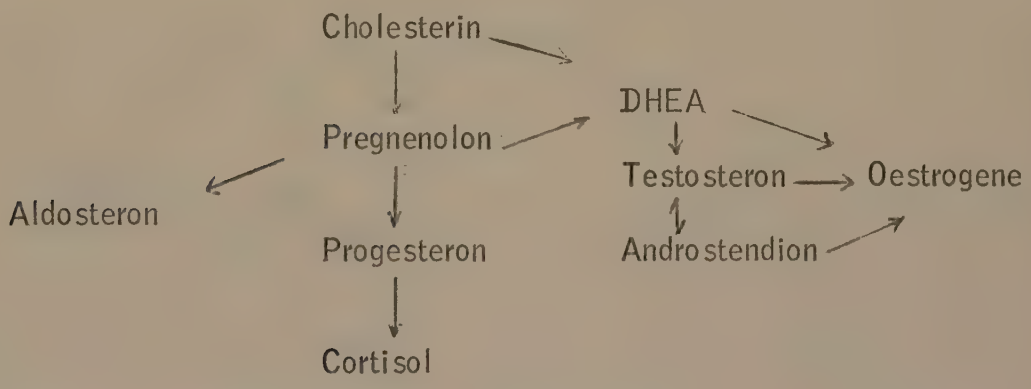

Abbildung 1: Biosyntheseschema von adrenalen und gonadalen Steroidhormonen.

Wie aus der Abb. 1 hervorgeht, haben sowohl die adrenalen Steroide der Corticosteroidreihe wie auch die Androgene und Oestrogene eine gemeinsame Vorstufe, nämlich das Cholesterin.

Die chemische Struktur des Cholesterins in ihrer konventionellen Schreib-

weise ist in Abb. 2 wiedergegeben.

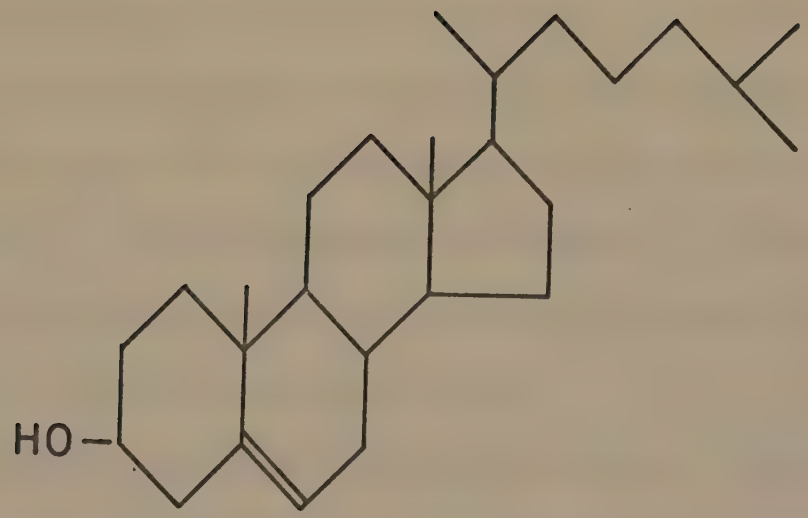

Abbildung 2: Chemische Struktur von Cholesterin.

Durch Oxydation der Seitenkette in Stellung C-20 und C-22 entsteht das Dihydroxycholesterin (8). Diese zweifache Oxydation stellt die Grundbedingung für die Abspaltung eines Teiles der Seitenkette unter Bildung von Isocapronsäure dar. Das gleichzeitig resultierende Steroid mit 21 C-Atomen, einer Δ 5-Doppelbindung, einer Ketogruppe in Stellung C-20 sowie einer Hydroxylgruppe in Stellung C-3 ist Preg-

nenolon. Durch Einwirken einer 3 β-ol-Dehydrogenase sowie dreier Hydroxylasen, die für die Hydroxylierung an den C-Atomen 17, 21 und 11 verantwortlich sind, und unter Einwirkung einer Isomerase, die die Doppelbindung aus Stellung 5 (6) in Stellung 4 (5) schiebt, entsteht Cortisol, der Hauptvertreter der Glucocorticoide. Als Zwischenprodukt tritt hierbei das Progesteron auf. Vom Pregnenolon ausgehend verläuft ein zweiter, biochemisch bedeutsamer Weg über die Zwischenstufe des 17α-Hydroxypregnenolons bei Abspaltung der Seitenkette in C-17 zu Dehydroepiandrosteron (Androstenolon), welches den Hauptvertreter der adrenalen Androgene darstellt.

Ein analoger Weg der Seitenkettenabspaltung wurde vom Progesteron ausgehend beschrieben und führt über 17α-Hydroxyprogesteron zu Δ 4-Androstendion, einem Steroidhormon, das ausgesprochen androgenen Charakter besitzt und in einem Redoxgleichgewicht mit Testosteron steht.

Testosteron, Androstendion und Dehydroepiandrosteron sowie die Metaboliten des Dehydroepiandrosterons, wie 16α-Hydroxydehydroepiandrosteron und Δ 5-Androstendiol, sind die eigentlichen Vorstufen der uns als klassisch bekannten Oestrogene. Die Umwandlung der 5 letztgenannten C-19-Steroide zu den 18 C-Atome enthaltenden Oestrogenen gilt als gesichert:

Die anguläre Methylgruppe C-19 wird in mehreren Oxydationsteilabschnitten als Formaldehyd abgespalten. Gleichzeitig kommt es zur Ausbildung einer Doppelbindung in Ring A, der nunmehr 2 Doppelbindungen und eine konjugierte Ketogruppe enthält. Durch Umlagerung zum phenolischen Ring A tritt die Stabilisierung des Moleküls ein.

Dieses Schema gilt für alle steroidbildenden Gewebe, wenn auch mit wesentlichen quantitativen Unterschieden. Diese sind wohl auf ein geschlechts- bzw. auf ein organspezifisches Enzymmuster zurückzuführen. So ist die Produktion an Androgenen im Ovar in der Geschlechtsreife, nicht dagegen in der Postmenopause, aus quantitativ sekretorischer Sicht unbedeutend (43), dagegen als Zwischenstufe bei der Bildung der Oestrogene nicht wegzudenken. Desgleichen findet auch in den Testes eine, wenn auch mengenmässig unbedeutende Bildung von Oestrogenen statt (22). Androgene wie Oestrogene entstehen darüber hinaus bei der Biosynthese von Steroiden in der Nebennierenrinde. Auch hier ist ihre Produktion von untergeordneter Bedeutung.

Die gleichen enzymatischen Leistungen hinsichtlich der Bildung von Oestrogenen wie von Progesteron vermag die Placenta zu vollbringen und teilweise auch die Leber, die für einen nicht zu unterschätzenden Anteil an der Oestrogenproduktion verantwortlich gemacht wird (1). Es muss in diesem Zusammenhang schliesslich darauf hingewiesen werden,

dass die Niere in der Lage ist, aus geeigneten Praekursoren wie Dehydroepiandrosteron Testosteron zu bilden.

Neben der unterschiedlichen Ausbildung des entsprechenden Enzymmusters wird eine exakte Beurteilung der Produktion einzelner Steroidmetaboliten durch die Tatsache erschwert, dass die oben genannten Biosyntheseschritte nicht allein das reine Steroidmolekül betreffen, sondern ebenso Steroidkonjugate.

Man war lange Zeit der Ansicht, dass die Steroidkonjugate, die insbesondere im Urin nachgewiesen werden, Substanzen darstellen, die biologisch und biochemisch inaktiv sind, vorwiegend in der Leber und anderen Zellsystemen gebildet werden (11 - 16, 36 - 38) und lediglich durch ihre Wasserlöslichkeit für die Ausscheidung von Steroiden durch die Niere Bedeutung besitzen. Neuere Untersuchungen haben allerdings ergeben, dass besonders auf dem Androgensektor und über die Umwandlung androgener Steroide zu oestrogenen Hormonen die Konjugation eine ausserordentlich bedeutsame Rolle spielt. So ist die Bildung von Oestrogenen aus konjugierten Vorstufen quantitativ wesentlich wichtiger als die Umwandlung der entsprechenden freien Steroide (18, 20, 28 - 30, 32 - 35). So kommt z. B. das Dehydroepiandrosteron im Organismus nur in geringen Mengen vor und stellt deshalb einen mengenmässig untergeordneten Precurser für Oestrogene dar. Demgegenüber erwies sich

die Umwandlung von Dehydroepiandrosteronsulfat zu Oestrogenen als wesentlich wichtiger (31). Das gleiche gilt auch für Δ 4-Androstendion, das eigentliche Androgen, wobei erst in letzter Zeit gezeigt werden konnte, dass auch dieses Steroid trotz seiner zwei Ketogruppen als Enolsulfat vorliegen kann (31). Man muss also neben den verschiedenen Wegen zu den Oestrogenen auch noch den Faktor der Konjugation berücksichtigen, wobei der Zeitpunkt der Konjugation theoretisch jedem der oben angegebenen metabolischen Einzelschritte zugeordnet werden kann.
Auf der anderen Seite ist unter der Wirkung von Steroidsulfatasen auch der umgekehrte Weg möglich, nämlich eine Abspaltung des Sulfatrestes. Es handelt sich dabei auch keineswegs um rein theoretische Ueberlegungen, sondern um experimentell belegte Ergebnisse. Sowohl durch in vivo- als auch durch in vitro-Versuche konnten die einzelnen metabolischen Schritte unter Einbeziehung der jeweiligen Konjugate nachgewiesen werden, und zwar mit Hilfe von radioaktiv markierten Steroiden bzw. doppeltmarkierten Steroidkonjugaten (7, 17 - 19). In den zugrundeliegenden Versuchen liessen sich nicht nur einzelne Biosyntheseschritte, sondern auch die vollständige Reihe vom Cholesterin bis zu den Oestrogenen derart aufzeigen. Erheblich erschwert werden allerdings derartige Probleme dadurch, dass die Ausbeute an Endprodukten im allgemeinen sehr gering ausfällt, besonders wenn man frühe Vorstufen in der Biosynthese ver-

wendet (40). Dies ist einmal durch die Verdünnung mit endogenen Steroiden zu erklären, zum anderen durch eine weitgehende Verteilung der eingesetzten Radioaktivität auf zahlreiche Verbindungen, die auf verschiedenen Biosynthesewegen entstehen, und schliesslich durch den Verlust an Aktivität im Verlauf des Metabolismus von Endstufen und Praekursoren.

Die Steuerung der Produktion biologisch aktiver Steroidhormone unterliegt, wie oben erwähnt, den dazugehörenden tropen Hormonen. Bei der jedoch grundsätzlich übereinstimmenden Enzymabhängigkeit der Steroidproduktion, sowohl in der Corticoid-, wie auch der Androgen- bzw. Oestrogenreihe sind Einflüsse von ACTH auf das Ovar, andererseits aber auch Einflüsse von Gonadotropinen auf die Nebennierenrinde denkbar. So ist bekannt, dass ACTH neben der Stimulation der Corticosteroidsynthese in der Nebennierenrinde eine Abnahme der Ascorbinsäure in diesem Gewebe mit sich bringt. Der gleiche Effekt kann unter ACTH auch im Ovar nachgewiesen werden. Der Nachweis einer Ascorbinsäuredepletion im Ovar ist allerdings kein direkter Hinweis auf eine Wirkung von ACTH auf die Steroidsynthese in den Eierstöcken. Sie kann jedoch als möglich angesehen werden (Persönl. Mitteilung von W. RINDT).

Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Gonadotropine auf

die Steroidbiosynthese der Nebennierenrinde offensichtlich Einfluss zu nehmen vermögen (4, 10, 44, 45). Ein derartiger Einfluss konnte in einem Tierversuch wahrscheinlich gemacht werden, bei dem man kastrierte männliche Meerschweinchen mit Gonadotropinen behandelte und deren Einfluss auf die Plasmasteroide untersuchte (4).

Eine Stimulation der Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde durch Gonadotropine scheint wahrscheinlich, wenn auch anderweitige Einflüsse, etwa im Rahmen des Metabolismus, nicht ausgeschlossen werden können.

Es schien daher von Interesse, den Einfluss von Gonadotropinen auf die Biosynthese von Steroiden an der isolierten Nebennierenrinde in einem in vitro-Versuch zu untersuchen und zwar vorerst unter Verwendung von tritiummarkiertem Cholesterin. Aus Gründen, auf die in der Diskussion noch näher einzugehen sein wird, wurde dabei ein Präparat von Serumgonadotropin verwandt.

II. Eigene Untersuchungen

Versuchsanordnung

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden 18 männliche, erbreine Meerschweinchen vom Stamm "Pirbright white" mit einem Gewicht von 400 ± 40 g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte unter konstanten Bedingungen. Das Futter bestand aus Altromin MS (Altrogge, Lage/Lippe) sowie Wasser ad libitum.

Drei Wochen vor Versuchsbeginn wurden 9 Tiere kastriert: In Nembutal-Aether-Narkose liessen sich nach Durchtrennung von Haut und Bindegewebe die Hoden hervorziehen und der Stiel nach vorheriger Torsion abbinden und durchtrennen. Anschliessend wurden die Wunden zweischichtig vernäht und mit Nebacetin-Puder behandelt.

Je 3 normale und kastrierte Tiere erhielten 10 IE Predalon S (Organon, Oss/Holland) i.m., die übrigen Meerschweinchen statt dessen physiologische Kochsalzlösung.

5 Stunden nach der Injektion wurden sämtliche Tiere dekapitiert, die Nebennieren freipräpariert und unter standardisierten Bedingungen im

Eisbad in Tris-Puffer pH 7,2 mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Zum Homogenat der Nebennieren von je 3 normalen und kastrierten Tieren wurden je 2 IE Predalon S zugegeben.

Es ergeben sich insgesamt 6 Versuchsgruppen:

I Normaltiere

II Normaltiere, in vivo mit Serumgonadotropin behandelt

III Normaltiere, deren Nebennierenrindenhomogenat mit Serumgonadotropin versetzt wurde

IV Kastrierte Tiere

V Kastrierte Tiere, die in vivo mit Serumgonadotropin behandelt wurden

VI Kastrierte Tiere, deren Nebennierenhomogenat mit Serumgonadotropin versetzt wurde

Die Bebrütung des Vollhomogenates erfolgte im Schüttelwasserbad bei 37 ^{0} C über eine Stunde unter Zugabe von etwa 400.000 Impulsen/min (Packard Tricarb Szintillationszähler, Typ 314 EX) 7< - ^{3}H-Cholesterin (Radiochemical Center, Amersham, England). Die spezifische Aktivität betrug 3,45 c/mM.

Chemische Aufarbeitung der Homogenate (25)

1. Extraktion und Reinigung der freien Steroide und Steroidkonjugate

a) Freie Steroide

Zur Extraktion der freien Steroide wurden die einzelnen Homogenate mit 1 Vol. Wasser verdünnt und mit eisgekühltem Methylenchlorid geschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde das Methylenchlorid abgesaugt und der Vorgang noch zweimal durchgeführt.

Die Extrakte wurden sodann mit jeweils 10 ml einer 0,1 n Natronlauge und anschliessend mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und bei 35 ^{0} C im Rotationsverdampfer eingedampft. Zur Entfernung der Lipoide wurde der so gewonnene Rückstand 12 Std. in 70 %igem Methanol aufbewahrt, dann zentrifugiert, mit Methanol-Aether (1:3, v/v) versetzt und eingedampft.

b) Gesamtkonjugate

Die praeextrahierten Homogenate versetzt man mit je 5 Vol. Aceton-Aethanol (1:1, v/v) und schüttelt 30 min bei 37 ^{0} C zur Praecipitation des gesamten Eiweisses. Die Suspension wurde filtriert und der Rückstand mit etwa 5 ml Aceton-Aethanol (1:4, v/v) nachgewaschen.

Das Eindampfen des Extraktes erfolgte im Rotationsverdampfer bei 37 °C auf etwa 2 ml.

2. Trennung der Steroidkonjugate in Einzelkomponenten

a) Trennung der Sulfate von Sulfatiden und Glucuronosiden

Zur Trennung der Sulfate von Sulfatiden und Glucuronosiden benutzte man die Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Upsala). Dabei wurde das DEAE vor Aufbringen der Extrakte 45 min mit 0,5 n Salzsäure, mit Wasser bis zur neutralen Reaktion, anschliessend 45 min mit 0,5 n Natronlauge und wieder mit Wasser bis zur neutralen Reaktion vorbehandelt. Dann wurde das DEAE-Sephadex mit 90 %igem Methanol und Chloroform-Methanol-Wasser (1:9:2, v/v) gewaschen.

Der unter 1. b) gewonnene, die Gesamtkonjugate enthaltende Rückstand wurde mit 10 ml Chloroform-Methanol (1:9, v/v) aufgenommen und auf die Säule aufgetragen.

Die Elution erfolgte mit folgenden Lösungsmitteln:

1. Chloroform-Methanol-Wasser (1:9:2, v/v)
2. Methanol-Wasser (8:2, v/v)
3. Wasser

4. 1 Mol Ammoniumsulfat + 0,1 Vol. 1 n Schwefelsäure

Nach OERTEL u.a. (25) findet man Sulfatide und Glucuronoside im ersten und zweiten Eluat. Die Sulfate sind im vierten Eluat vorhanden.

b) Trennung der Sulfatide von Glucuronosiden

Die Sulfatide und Glucuronoside enthaltenden Eluate wurden im Rotationsverdampfer eingeengt, mit 5 %igem Natriumbicarbonat versetzt und mehrmals mit Aethylacetat extrahiert. Es sind die Sulfatide in der organischen (Aethylacetat) und die Glucuronoside in der wässrigen Phase (Natriumbicarbonat) gelöst.

3. Spaltung der Steroidkonjugate

a) Steroidsulfate und -sulfatide

Die Aufspaltung der Steroidsulfate und -sulfatide gelang durch Solvolyse nach BURSTEIN und LIEBERMAN (5). Untersuchungen von OERTEL (Persönl. Mitteilung) hatten ergeben, dass diese Solvolyse für die Spaltung von Sulfaten und Sulfatiden brauchbar ist.

Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen sulfat- und sulfatidhaltigen Rückstände in je 20 ml Wasser gelöst, mit 2 g Natriumchlorid versetzt und

nach Ansäuern mit 1 ml konz. Schwefelsäure zweimal mit 20 ml Aethylacetat extrahiert. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 ° C wurden die Solvolysate mit 1 n Natronlauge und Wasser gewaschen, wie unter 1. a) angegeben entfettet und die resultierenden Extrakte im Rotationsverdampfer bei 37 ° C zur Trockne gebracht.

b) Steroidglucuronoside

Die in der wässrig-alkalischen Phase (Natriumbicarbonatlösung) enthaltenen Glucuronoside wurden mit β-Glucuronidase enzymatisch gespalten. Hierzu versetzte man die wässrige Lösung mit 0,1 Vol. Acetatpuffer von pH 4,75 und 1000 E β-Glucuronidase (Ketodase, Warner-Chilcott, Morris-Plains, N.J., USA) pro ml Lösung und inkubierte 48 Std. bei 37 ° C. Anschliessend wurde dreimal mit je 2 Vol. Methylenchlorid extrahiert, die so gewonnenen Extrakte mit 1,0 n Natronlauge und Wasser gewaschen, getrocknet und im Rotationsverdampfer bei 37 ° C eingedampft.

4. Chromatographie der freien und freigesetzten Steroide

Zur dünnschichtchromatographischen Trennung auf Kieselgel-G der Steroide kamen folgende Systeme zur Anwendung:

1. Hexan-Aether-Methanol-Eisessig
   (90:20:3:2, v/v)

2. Chloroform-Aethanol
   (9:1, v/v)

3. Chloroform-Dioxan
   (94:6, v/v)

Zonen mit markierten Steroiden wurden im Dünnschichtscanner LB 2720 (Labor Prof. Berthold, Wildbad) lokalisiert und an Hand von Chromatographien gleichzeitig gelaufener, unmarkierter Testsubstanzen vorläufig charakterisiert.

5. Quantitative Messung

Die im Dünnschichtscanner festgestellten steroidhaltigen Abschnitte wurden mit Methanol eluiert, die Eluate eingedampft und ein Teil der in Methanol aufgenommenen Rückstände der quantitativen Messung von ^{3}H-Aktivität dem Packard Tricarb Szintillationszähler vom Typ 314 EX zugeführt. Die Messung erfolgte in 0,1 ml Methanol +20 ml Szintillationsflüssigkeit (4 % POP +0,04 % Dimethyl-POPOP in Toluol).

6. Charakterisierung

Die Charakterisierung der Steroide Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon, 17-OH-Pregnenolon, Progesteron und 17-OH-Progesteron geschah durch Ueberführung in 2,4-Dinitrophenylhydrazone und deren Chromatographie bis zur konstanten spezifischen Aktivität.

Zur Bildung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone benutzte man die Methode nach TREIBER und OERTEL (46, 47), wobei die Steroide mit 25 µg 2,4-Dinitrophenylhydrazin und mit 25 µg Trichloressigsäure in absolutem Benzol durch Inkubation über 30 min bei 60 ^{o} C in die entsprechenden Hydrazone überführt wurden.

Die Chromatographie der Hydrazone erfolgte auf Kieselgel-G im Lösungsmittelsystem Chloroform-Dioxan (94:6, v/v).

Die Charakterisierung der übrigen Steroide gelang ebenfalls durch umgekehrte Isotopenverdünnung und Chromatographie bis zu konstanter spezifischer ^{3}H-Aktivität in den Systemen 1 und 2 unter Benutzung der UV-Absorption zur quantitativen Erfassung von Δ 4-3-Ketosteroiden.

Tabelle I: Chemische Bezeichnung und Trivialname der gefundenen Substanzen.

Cholesterol	Cholesterin
3β-Hydroxy-pregn-5-en-20-on	Pregnenolon
Pregn-4-en-3,20-dion	Progesteron
17-Hydroxy-pregn-4-en-3,20-dion	17-OH-Progesteron
11β,17α,21-Trihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion	Hydrocortison
11β,21-Dihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion	Corticosteron
3β,17α-Dihydroxy-pregn-5-en-20-on	17-OH-Pregnenolon
3β-Hydroxy-androst-5-en-17-on	Dehydroepiandrosteron (DHEA)
Androst-4-en-3,17-dion	Androstendion

Tabelle II: Bebrütung von Nebennieren normaler Meerschweinchen mit 7α-^{3}H-Cholesterin. Impulsraten der freien und konjugierten Steroide.

	freie Steroide	Sulfatide	Sulfate
Cholesterin	186830	31110	18930
Pregnenolon	-	-	-
Progesteron	12780	3480	220
17-OH-Progesteron	-	-	-
Corticosteron	15330	-	970
Hydrocortison	10400	-	-
17-OH-Pregnenolon	11930	845	-
Dehydroepiandrosteron	-	-	-
Androstendion	8340	-	-
	245610	35435	20120
% der wiedergefundenen Aktivität	80,1	11,4	6,6

Glucuronoside 5750 lpm = 1,9 %

Gesamtaktivität 306915 (77 % der eingesetzten Aktivität)

Tabelle III: Bebrütung von Nebennieren normaler, mit Serumgonadotropin behandelter Meerschweinchen mit 7α-^{3}H-Cholesterin. Impulsraten der freien und konjugierten Steroide.

	freie Steroide	Sulfatide	Sulfate
Cholesterin	167040	88160	16430
Pregnenolon	-	-	435
Progesteron	12705	2920	310
17-OH-Progesteron	-	7050	-
Corticosteron	6220	5785	105
Hydrocortison	4055	5450	230
17-OH-Pregnenolon	2655	32680	1670
Dehydroepiandrosteron	1130	-	-
Androstendion	2005	-	-
	195810	142045	19180
% der wiedergefundenen Aktivität	54,6	39,7	5,4

Glucuronoside 1360 lpm = 0,3 %

Gesamtaktivität 358395 (89 % der eingesetzten Aktivität)

Tabelle IV: Bebrütung von Nebennieren normaler Meerschweinchen mit Serumgonadotropin und 7α-^{3}H-Cholesterin. Impulsraten der freien und konjugierten Steroide.

	freie Steroide	Sulfatide	Sulfate
Cholesterin	182220	63310	7130
Pregnenolon	610	-	-
Progesteron	17150	15970	-
17-OH-Progesteron	-	-	-
Corticosteron	5930	9460	920
Hydrocortison	9820	-	-
17-OH-Pregnenolon	13630	2890	-
Dehydroepiandrosteron	550	-	-
Androstendion	3685	-	-
	233595	90330	8050
% der wiedergefundenen Aktivität	69,5	27,0	2,4

Glucuronoside 3730 lpm = 1,1 %

Gesamtaktivität 335705 (84 % der eingesetzten Aktivität)

Tabelle V: Bebrütung von Nebennieren kastrierter Meerschweinchen mit 7-^{3}H-Cholesterin. Impulsraten der freien und konjugierten Steroide.

	freie Steroide	Sulfatide	Sulfate
Cholesterin	182280	35850	22000
Pregnenolon	-	-	-
Progesteron	8020	7050	120
17-OH-Progesteron	-	-	-
Corticosteron	14540	12170	-
Hydrocortison	8420	-	-
17-OH-Pregnenolon	6650	3720	1130
Dehydroepiandrosteron	-	-	-
Androstendion	1465	-	-
	219175	58790	23250
% der wiedergefundenen Aktivität	71,4	19,1	7,6

Glucuronoside 5700 lpm = 1,9 %

Gesamtaktivität 306915 (77 % der eingesetzten Aktivität)

Tabelle VI: Bebrütung von Nebennieren kastrierter und mit Serumgonadotropin behandelter Meerschweinchen mit 7α-^{3}H-Cholesterin. Impulsraten der freien und konjugierten Steroide.

	freie Steroide	Sulfatide	Sulfate
Cholesterin	155320	31300	43600
Pregnenolon	-	-	8940
Progesteron	13650	2840	430
17-OH-Progesteron	-	-	-
Corticosteron	4350	-	2490
Hydrocortison	9970	4160	1790
17-OH-Pregnenolon	6985	-	-
Dehydroepiandrosteron	-	-	21630
Androstendion	1880	-	-
	192155	38300	78880
% der wiedergefundenen Aktivität	61,7	12,3	25,4

Glucuronoside 1790 lpm = 0,6 %

Gesamtaktivität 311125 (78 % der eingesetzten Aktivität)

Tabelle VII: Bebrütung von Nebennieren kastrierter Meerschweinchen mit Serumgonadotropin und 7α-^{3}H-Cholesterin. Impulsraten der freien und konjugierten Steroide.

	freie Steroide	Sulfatide	Sulfate
Cholesterin	130780	22770	28550
Pregnenolon	12450	3805	-
Progesteron	30555	2250	-
17-OH-Progesteron	130	-	-
Corticosteron	7710	2560	10600
Hydrocortison	6845	47070	660
17-OH-Pregnenolon	9605	4770	-
Dehydroepiandrosteron	17385	2710	-
Androstendion	2720	-	-
	218180	85935	39810
% der wiedergefundenen Aktivität	63,2	24,9	11,5

Glucuronoside 1320 lpm = 0,4 %

Gesamtaktivität 345245 (86 % der eingesetzten Aktivität)

III. Ergebnisse

In den Tabellen II bis VII sind die Impulsraten der einzelnen, in Tabelle I aufgeführten Steroide wiedergegeben. Die Gesamtausbeute der jeweils eingesetzten Aktivität betrug zwischen 77 % und 89 %.
Infolge der niedrigen Ausbeute an Glucuronosiden wurden diese nicht weiter aufgearbeitet, sondern in ihrer Gesamtheit gemessen.

Innerhalb der Fraktionen freier Steroide und ihrer Konjugate ist unter Gonadotropineinfluss eine vermehrte Bildung von Sulfokonjugaten zu erkennen. Daneben besteht offenbar eine Tendenz zur bevorzugten Bildung von Sulfatiden.
Unabhängig von den Konjugatfraktionen ist an Hand dieses Versuchsmodells die Biosynthese von Dehydroepiandrosteron unter Gonadotropineinfluss auffällig und zwar ohne direkte Korrelation zur Bildung von 17-OH-Pregnenolon.
Die gleiche Beobachtung trifft für Pregnenolon zu, während Progesteron und 17-OH-Progesteron unbeeinflusst scheinen.
Hydrocortison einerseits und Androstendion andererseits zeigen kein einheitliches Verhalten.

IV. Diskussion

Zur Erfassung einzelner Stoffwechselfunktionen können verschiedene Wege beschritten werden. Einmal ist es möglich, sich auf Grund allgemeiner Beobachtungen ein mehr oder minder teleologisches Bild der einzelnen Funktionen im Rahmen des Ganzen zu machen. Eine Näherung an die tatsächlichen Verhältnisse ergibt sich dagegen erst aus der Analyse der Endzustände, wie dies in etwa bei der Bestimmung von Metaboliten im Urin geschieht. Derartige Beobachtungen lassen jedoch nur Aussagen über gröbere Störungen bzw. Abweichungen vom Normalstatus zu, da eine Vielzahl von metabolischen Schritten unberücksichtigt bleibt. Verstärkt wird die Aussagekraft derartiger Beobachtungen allerdings durch statistische Erfahrungen, die letztlich nur durch die Erfassung höhergeordneter Mechanismen ermöglicht wurden. Zu Konzentrationsuntersuchungen im Urin und auch im Blut muss jedoch ganz allgemein gesagt werden, dass sie lediglich Momentaufnahmen darstellen, die primär keine Rückschlüsse auf die Kinetik im aktuellen Stoffwechsel zulassen.

Zur genaueren wissenschaftlichen Erfassung einerseits und zur Einteilung

subtilerer Mechanismen andererseits sollte man jedoch geeignete Testmethoden ausarbeiten und anwenden. Derartige dynamische Studien zur Beurteilung von Stoffwechselprozessen sind heute bereits in Klinik und Forschung weitgehend eingeführt. Hier bedient man sich beispielsweise der Stimulierung bzw. der Hemmung bekannter Mechanismen. Der Aufbau eines solchen in vivo-Testes wird aber durch eine Vielzahl von Möglichkeiten beeinflusst, die primär im Versuchsmodell nicht erscheinen. Vorteile einer derartigen Versuchsanordnung ergeben sich dadurch, dass verschiedene, normalerweise vorhandene Einflüsse berücksichtigt werden, ohne dass darüber eine genaue Analyse möglich ist und bei kritischer Beurteilung letztlich auch nicht unabdingbar erscheint. Durch die Kenntnis verschiedener Möglichkeiten für eine unspezifische Einflussnahme kann das Versuchsmodell in etwa so aufgebaut werden, dass solche Effekte vernachlässigt werden können. Dennoch werden derartige, oft nicht zu definierende Einflüsse die Spezifität der Aussage beeinträchtigen. Letzteres Kriterium lässt sich demnach nur durch ein Ausschalten möglichst aller unspezifischer Einflüsse erhöhen. Dies ist im lebenden Gesamtorganismus, also in einem in vivo-Test, nicht möglich.

Eine spezifiziertere Aussage hinsichtlich einzelner Organleistungen lässt sich z.B. durch geeignete Perfusionsstudien gewinnen. Während geeignete Testmethoden für die Analyse des Hormonhaushaltes, etwa ein ACTH-

oder auch ein Metopiron-Test immer noch durch Sekundärorgan wie die Leber beeinflusst werden, lassen Perfusionsversuche der Nebennierenrinde gezieltere Schlüsse auf die aktuelle Situation in diesem Organ zu. Eine weitergehende Ausschaltung von störenden Einflüssen bzw. von schlecht erfassten Einflüssen, lässt sich durch in vitro-Versuche erziele n. Die Isolierung eines Organs aus dem Gesamtorganismus bringt allerdings den Verlust zusätzlicher, normalerweise vorhandener Stimuli mit sich. Die Spezifität der Aussage wird jedoch durch die Einengung der Kollektiveigenschaften verstärkt. Die zu bestimmenden Parameter unterliegen dabei den leichter zu reproduzierenden Bedingungen, die letztlich eine Standardisierung des Versuches ermöglichen.

Durch den Verlust der Beziehung auf den Gesamtorganismus sind quantitative Aussagen sicher nicht mehr möglich. Auch die qualitative Aussage muss einer scharfen Kritik unterliegen, da unter Umständen wesentliche Bezugsgrössen nicht berücksichtigt wurden. Im einzelnen lassen sich aber bestimmt Tendenzen im Rahmen enzymatischer Schritte absehen.

Die Aussage derartiger Versuche wird durch eine weitgehende Aufschlüsselung der möglichen Ergebnisse erweitert. In dieser Hinsicht darf im vorliegenden Fall Folgendes postuliert werden: Durch die Erfassung ein-

zelner Konjugate wie auch von Metaboliten in den betreffenden Konj
gatfraktionen scheint eine Aussage bezüglich des hier angewandten V
suchsmodells im Rahmen der bisher bekannten Stoffwechselschritte
weitgehend gesichert. Eingeschränkt wird die Aussagekraft durch m
thodisch bedingte Verluste. Es kann jedoch gesagt werden, daß die
hier angewandten Methoden sich hinsichtlich ihrer Ergebnisse weitg
hend reproduzieren lassen. Was den Versuchsansatz betrifft, so ist
ebenfalls eine weitgehende Standardisierung möglich, da im vorliege
den Fall ein reinerbiger Stamm verwendet wurde. An dieser Stelle
wäre bezüglich der hier bestimmten Sulfokonjugate - Sulfatide und S
fate - Folgendes festzustellen: Die Auftrennung in diese beiden Konj
gatformen erschien auf Grund des sehr unterschiedlichen biologische
Verhaltens beider Substanzen erforderlich (23, 24, 26, 27). Die Sul
fate unterscheiden sich von den Sulfatiden dadurch, daß letztere Di-
ester der Schwefelsäure darstellen und statt des anionischen Charak
ters lipophile Eigenschaften besitzen. Einschränkend muß jedoch be-
tont werden, daß im Verlauf einer biochemischen Aufarbeitung eine
gewisse Menge an Sulfatid zu Sulfaten gespalten werden kann, so da
Aussagen innerhalb der Biogenese beider Konjugatformen über den S
fatid-Sulfat-Quotient nur bedingt möglich sind. Weiterhin wurden
sämtliche Versuchsschritte bis zur biochemischen Aufarbeitung

unter streng konstanten Bedingungen gehalten. Erschwert wird die exakte Aussage auch durch die Tatsache, dass der angewandte Stimulus, nämlich Serumgonadotropin, nicht exakt definiert ist. Wichtig für den vorliegenden Versuch ist der Einsatz von Serumgonadotropin jedenfalls insofern, als sich dieses von den sonst gebräuchlichen Gonadotropinpräparationen aus dem Urin durch seinen Gehalt an N-acetyl-neuraminsäure (NANA) unterscheidet (6). N-acetyl-neuraminsäure ist nämlich wesentlich mit der biologischen Aktivität der Gonadotropine verknüpft. Zwar wurden bei diesem Präparat FSH-Aktivitäten im Augmentationstest nachgewiesen, doch blieben andere Aktivitäten, z.B. im Bereich des LH bzw. im Bereich kovalenter Proteinfraktionen, unberücksichtigt. Es lässt sich also diesbezüglich keine spezifische Aussage machen. Immerhin gewinnen die Ergebnisse im Rahmen der organischen Gesamtregulation stärkeres Gewicht.

Als hervorstechendes Ereignis hinsichtlich der hier gewonnenen Ergebnisse ist die vermehrte Sulfokonjugatbildung unter dem Einfluss von Gonadotropinen festzuhalten. Nimmt man eine derart stimulierte Sulfurylierung von Steroiden als gesichert an, so gewinnt dies letztlich Bedeutung für die Biogenese von Einzelsteroiden. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass im Vergleich zum Ablauf bei den freien Steroiden eine Reihe von

biosynthetischen Schritten bevorzugt in der Fraktion der Sulfokonjugate abläuft (31 u.a.). Was die verschiedenen, hier bestimmten Steroide angeht, so lässt die Synthese von Androstendion und von Cortisol als Vertreter biosynthetischer Endprodukte keine Schlüsse auf eine Gonadotropinwirkung zu. Dies ist nicht zuletzt dadurch bedingt, dass der zeitliche Ablauf derartig vieler biosynthetischer Einzelschritte, die zur Bildung der genannten Steroide erforderlich sind, nicht berücksichtigt werden konnte.

Aussagen sind jedoch möglich hinsichtlich von Praekursoren, deren vermehrte Bereitstellung, wie etwa von Pregnenolon, unter dem Einfluss von Serumgonadotropin besonders auffällig ist. Letztlich besitzt gerade die Bereitstellung solcher Steroide für weitere biosynthetische Schritte Bedeutung.

Weiterhin ist das vermehrte Auftreten von DHEA unter Gonadotropinen auffallend. Die relativ geringe Menge mag durch die gewählte Versuchsanordnung bedingt sein. Interessant bleibt in diesem Zusammenhang die fehlende Korrelation zu 17-OH-Pregnenolon, das als Vorläufer des DHEA bekannt ist. Die Erklärung könnte ebenfalls in den Besonderheiten des Versuchsmodells zu suchen sein, wenngleich auch die Möglichkeit eines direkten Biosyntheseweges von Cholesterin zu DHEA besteht. Dies wurde bereits verschiedentlich beschrieben. Unter dem Aspekt einer

mangelhaften Reaktion adrenaler Androgene (DHEA) auf ACTH beim Meerschweinchen mag dieser Befund neue Bedeutung gewinnen (42). Auswertbare Unterschiede zwischen normalen und kastrierten Meerschweinchen scheinen hier nicht vorzuliegen, so dass eine Interpretation eines anabolen Effektes gonadaler Steroide nicht möglich erscheint. Interessant ist jedoch, dass die hier dargestellten Ergebnisse eine Ergänzung entsprechender in vivo-Versuche darstellen, in denen ebenfalls ein Gonadotropineffekt deutlich zutage trat (4). Unter Berücksichtigung aller genannten Kriterien kann gesagt werden, dass die adrenale Biosynthese von Steroiden nicht unabhängig von Gonadotropinen verläuft (3, 5). Ob ein derartiger Befund auf den menschlichen Metabolismus übertragbar ist, sei dahingestellt. Bei der grossen Aehnlichkeit des Steroidmetabolismus bzw. der Steroidbiosynthese bei Mensch und Meerschweinchen sollten derartige Effekte jedoch berücksichtigt werden (42).

V. Zusammenfassung

Einleitend wird auf die Regulation und Biogenese von Steroiden in der Nebennierenrinde eingegangen. Nachdem in Tierversuchen in vivo ein regulativer Einfluss von Gonadotropinen auf die Nebennierenrindenfunktion wahrscheinlich gemacht werden konnte, schien es interessant, entsprechende Versuche in vitro anzustellen.

Nebennieren von normalen und kastrierten Meerschweinchen wurden nach in vivo-Vorbehandlung bzw. unter in vitro-Zusatz von Serumgonadotropin mit 7α-^{3}H-Cholesterin bebrütet. Neben verschiedenen C-21-Steroiden konnten die C-19-Steroide DHEA und Androstendion nachgewiesen werden. Unter dem Einfluss von Serumgonadotropin war die Ausbeute an DHEA sowie die der gesamten Sulfokonjugate gesteigert.

Es wird daraus geschlossen, dass Gonadotropine beim Meerschweinchen in die Regulation der adrenalen Steroidbiosynthese eingreifen können.

VI. Schrifttum

1. ADLERCREUTZ, H.: Oestrogene und Lebererkrankungen. Oestrogene Hypophysentumoren; S. 33. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 196

2. APOSTOLAKIS, M. und VOIGT, K.D.: Gonadotropine. G. Thieme Verlag, Stuttgart 1965.

3. BAULIEU, E.E.; CORPECHOT, C. and EMILIOZZI, R.: H^3androsten-3β-17α-diol-S^{35}sulfate in vivo: an example of the direct metabolism of a steroid conjugate. Steroids 3: 429 (1963).

4. BUEHNER, P.; RINDT, W. und OERTEL, G.W.: Wirkung von Gonadotropinen auf die Nebennierenrinde (I). Endokrinologie 51: 303 (1967).

5. BURSTEIN, S. and LIEBERMAN, S.: A solvolysis procedure for steroid conjugates.
J. Biol. Chem. 233: 331 (1959).

6. BUTT, W.R.: Eigenschaften des gereinigten menschlichen hypophysären FSH.
II. Intern. Colloq. Human Gonadotropins, Barcelona 1969.

7. DIETRICH, P.; RINDT, W. und KAISER, E.: Konjugation von Hydrocortison-4-C-14 unter dem Einfluss endokriner Stimulation.
Endokrinologie 50: 251 (1966).

8. DOCUMENTA GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen;
s. 424 ff. (1968).

9. FIESER, L. und FIESER, M.F.: Steroide.
Chemie Verlag, Weinheim/Bergstr. 1961.

10. FRASCHINI, G.; GAVAZZI, G. and GUILIANIS, G.: Hormonal steroids; ed. by Martini, L. and Pecile, A.; S. 325.
Acad. Press, New York-London 1965.

11. KAISER, E.; RINDT, W. und ZIMMERMANN, W.: Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen. I. Mitteilung.
Acta hepato-splenol. 11: 321 (1964).

12. KAISER, E. und RINDT, W.: Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen. II. Mitteilung.
Klin. Wschr. 42: 646 (1964).

13. KAISER, E. und RINDT, W.: Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen. V. Mitteilung.
Dtsch. med. Forschg. 2: 163 (1964).

14. KAISER, E. und RINDT, W.: Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen.
Mat. med. Nordmark 17: 543 (1965).

15. KAISER, E.; RINDT, W. und OERTEL, G.W.: Steroidmetabolismus bei Lebererkrankungen.
Acta hepato-splenol. 12: 12 (1965).

16. KAISER, E. und RINDT, W.: Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen.
Endokrinologie 49: 69 (1965/66).

17. KNAPSTEIN, P.; RINDT, W. und OERTEL, G.W.: Ueber den Metabolismus von 7α-^{3}H-markiertem freiem DHEA, DHEA-sulfat und DHEA-sulfatid in Plasma, Galle und Urin beim Meerschweinchen.
12. Symp. Dtsch. Ges. Endokrinologie, Wiesbaden 1966.

18. KNAPSTEIN, P.; WENDELBERGER, F. and OERTEL, G.W.: Direct metabolism of 7α-^{3}H-DHEA-3-^{14}C-Glucuronoside.
Sep. Experientia 22: 785 (1966).

19. KNAPSTEIN, P.; RINDT, W.; WENDELBERGER, F. und OERTEL, G.W.: Plasma-Halbwertszeit, Exkretion und direkter Metabolismus von Androstenolon-glucuronosid beim Menschen. Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 348: 93 (1967).

20. KNAPSTEIN, P.; WENDELBERGER, F.; MENZEL, P. und OERTEL, G.W.: In vivo-Perfusion eines menschlichen Testis mit (4-^{14}C)Androstenolon und (7α-^{3}H)Androstenolon-(^{35}S)sulfat. Hoppe Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 348: 990 (1967).

21. LUNENFELD, B.: Factors besides gonadotrophin and clomiphen stimulating ovarian function. 50. Nobel Symposium, Stockholm 1970.

22. LUNENFELD, B. and RINDT, W.: What can one expect of the treatment of male sterility. Gaz. Med. (im Druck).

23. OERTEL, G.W. and EIK-NES, K.B.: Dehydroepiandrosterone in blood. Isolation of complexes from human blood plasma, containing Dehydroepiandrosterone and phosphoric acid.
Acta Endocrinol. 30: 93 (1959).

24. OERTEL, G.W.: Ueber Steroidkonjugate im Plasma. Isolierung eines lipophilen, phosphathaltigen Dehydroepiandrosteron-konjugates.
Biochem. Zschr. 339: 135 (1963).

25. OERTEL, G.W.; KAISER, E. und ZIMMERMANN, W.: Bestimmung freier und konjugierter Steroide in Nebennieren-venenblut und peripherem Blut.
Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 331: 77 (1963).

26. OERTEL, G.W. und GROOT, K.: Ueber Steroidkonjugate im Plasma. In vivo-Biogenese von C-19-Steroid-sulfatiden.
Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 341: 204 (1965).

27. OERTEL, G.W. und GROOT, K.: Ueber Steroidkonjugate im Plasma. Isolierung, Eigenschaften und Zusammensetzung eines biosynthetischen, lipophilen Dehydroepiandrosteron-Konjugats. Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 341: 1 (1965).

28. OERTEL, G.W. und KNAPSTEIN, P.: In vivo-Biogenese und Metabolismus von ^{3}H- und ^{35}S-markierten C-19-Steroid-sulfatiden. Hoppe Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 344: 159 (1966).

29. OERTEL, G.W.; KNAPSTEIN, P. und TREIBER, L.: Direkter und indirekter Metabolismus von i.v.-verabreichtem ^{3}H- und ^{35}S-markiertem Androstenolon-sulfat. Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 345: 221 (1966).

30. OERTEL, G.W.; KNAPSTEIN, P. und TREIBER, L.: Zur Biogenese von freien und konjugierten Steroiden in der

menschlichen Nebenniere.
12. Symposium Dtsch. Ges. Endokrinologie, Wiesbaden 1966.

31. OERTEL, G.W.; TREIBER, L. and RINDT, W.: Direct aromatication of C-19-Steroid-sulfates.
Experientia 23: 97 (1967).

32. OERTEL, G.W.; WENDELBERGER, F.; MENZEL, P.; TREIBER, L. and KNAPSTEIN, P.: In vivo-perfusion of the testis with Dehydroepiandrosterone sulfate.
Europ. J. Steroids 2: 299 (1967).

33. OERTEL, G.W.; TREIBER, L.; WENZEL, D.; KNAPSTEIN, P.; WENDELBERGER, F. and MENZEL, P.: In vivo-perfusion of the human ovary with 4-^{14}C-Dehydroepiandrosterone and 7α-^{3}H-Dehydroepiandrosterone-^{35}S-sulfate.
Experientia 24: 607 (1968).

34. OERTEL, G.W.; MENZEL, P.; WENZEL, F.: In vivo-Metabolismus von (7α-^{3}H)Cholesterin-(^{35}S)sulfat.
Hoppe Seyler's Zschr. Physiol.Chem. 349: 1551 (1968).

35. OERTEL, G.W.; MENZEL, P.; WENZEL, D. und WENZEL, F.: In vivo-Metabolismus von (7α-^{3}H)3-hydroxy-5-pregnen-20-on-(^{35}S)sulfat. Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 349: 1543 (1968).

36. RINDT, W. und KAISER, E.: Beziehungen zwischen Milz und Nebennierenrindensteroiden. Mat. med. Nordmark 16: 499 (1964).

37. RINDT, W.; KAISER, E. und ZIMMERMANN, W.: Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen. IV. Mitteilung. Endokrinologie 47: 3 (1964).

38. RINDT, W.: Einfluss von Splenektomie und gleichzeitiger Verabreichung von pyrogenen Reizstoffen auf Steroide und Blutbild beim Meerschweinchen. Inauguraldissertation, Homburg 1965.

39. RINDT, W. und OERTEL, G.W.: Indirekte Nierenperfusion mit Dehydroepiandrosteron und seinen Konjugaten beim Meer-

schweinchen.
Acta endocr. (Kbh.) 55: 656 (1967).

40. RINDT, W. und OERTEL, G.W.: Einwirkung von Gonadotropinen auf adrenale Steroide beim Meerschweinchen.
13. Symposium Dtsch. Ges. Endokrinologie, Wiesbaden 1967.

41. RINDT, W.; HEINEN, G. und OERTEL, G.W.: Die hypophysäre ACTH-Reserve unter ovulationshemmender Behandlung.
Im Druck.

42. RINDT, W.; BRAUNBERGER, G.; KAISER, E.; OERTEL, G.W. und MENZEL, P.: Steroidhormone beim Meerschweinchen.
Im Druck.

43. RYAN, K.J.: Ovarian function in gynecologia endocrinopathies.
6th World Congr. Gynec. Obstet., New York 1970.

44. SUNDARARAJ, B.I. and GOSWANI, S.V.: "In vitro" productic of corticosteroids by luteinizing hormone: a new interpretation of LH-induced ovula- tion in catfish.
Excerpta Med. Found., Int. Congr. Series 1 368 (1966).

45. TELEDGY, G.; HERGENRODER, A. and LISSAK, K.: Furthe observations on the effect of the sexual hormone on the adrenal steroid secretion in the dog.
Excerpta Med. Found., Int. Congr. Series 1 250 (1966).

46. TREIBER, L. und OERTEL, G.W.: Zur Bestimmung von Ket steroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. I. Mitteilung: Beschreibung der Methode.
Zschr. Klin. Chem. 5: 83 (1967).

47. TREIBER, L.; RINDT, W. und OERTEL, G.W.: Zur Bestim- mung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitro- phenylhydrazin. II. Mitteilung: Anwendung der Methode bei Plasmaanalysen.
Zschr. Klin. Chem. 5: 102 (1967).

48. UFER, J.: Hormontherapie in der Frauenheilkunde.

W. de Gruyter Verlag, Berlin 1959.

Herrn Professor Dr. Dr. W. Zimmermann , Direktor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes in Homburg-Saar, danke ich für die Ueberlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut.

Herrn Professor Dr. G.W. Oertel ,danke ich für die Vergabe des Themas sowie für seine hilfreichen Arbeitsanleitungen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. W. Rindt für seine Anregungen bei der Durchführung der Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 8. 10. 1939 wurde ich, Claus Adolf Ebersohl, als zweites Kind des Oberingenieurs Wilhelm Ebersohl und seiner Ehefrau Maria, geb. Behringer, in Erkelenz geboren.

Von 1945 bis 1949 besuchte ich die Volksschule in Zweibrücken, anschliessend bis zur Reifeprüfung im März 1958 das Naturwissenschaftliche Gymnasium in Zweibrücken.

An der Universität des Saarlandes legte ich im Oktober 1959 das Vorphysikum, im Februar 1961 das Physikum und im Dezember 1964 das Staatsexamen ab.

Die Bestallung als Arzt erhielt ich im Februar 1966. Nach einem Jahr truppenärztlicher Tätigkeit war ich als Assistenzarzt am St. Hedwigskrankenhaus in Illingen-Saar tätig.

Seit Januar 1970 arbeite ich als Assistenzarzt an der Inneren Abteilung des Knappschaftskrankenhauses in Püttlingen-Saar.